

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003203

International filing date: 07 December 2004 (07.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0092300
Filing date: 17 December 2003 (17.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 14 February 2005 (14.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

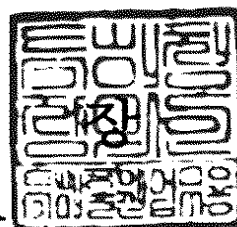
출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0092300 호
Application Number 10-2003-0092300

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 17일
Date of Application DEC 17, 2003

출 원 인 : 주식회사 케이티앤지
Applicant(s) KT&G CORPORATION

2005 년 1 월 10 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2003.12.17

【국제특허분류】 C12N

【발명의 명칭】 신규한 미생물 바실러스 아밀로리퀴페이선스
케이티지비0202 및 이를 이용한 식물병원균의 방제방법

【발명의 영문명칭】 THE NOVEL BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS KTGB0202 AND
CONTROL METHOD OF PLANT PATHOGENIC FUNGI USING THAT

【출원인】

 【명칭】 주식회사 케이티앤지

 【출원인코드】 2-1999-900119-7

【대리인】

 【성명】 김형준

 【대리인코드】 9-2000-000442-3

 【포괄위임등록번호】 2002-056645-2

【발명자】

 【성명의 국문표기】 김갑식

 【성명의 영문표기】 KIM,Kab-Sig

 【주민등록번호】 500811-1162412

 【우편번호】 305-806

 【주소】 대전광역시 유성구 어은동 99번지 한빛아파트 116동
1501호

 【국적】 KR

【발명자】

 【성명의 국문표기】 여운형

 【성명의 영문표기】 YEO,Woon-Hyung

 【주민등록번호】 620118-1402814

 【우편번호】 301-150

 【주소】 대전광역시 중구 태평동 태평아파트 109동 1306호

 【국적】 KR

【심사청구】 청구

【미생물기탁】

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국생명공학연구원 유전자은행

【수탁번호】 KCTC 10564BP

【수탁일자】 2003.12.10

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 1

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
김형준 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 4 면 4,000 원

【우선권 주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 6 항 301,000 원

【합계】 334,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 신규한 미생물 바실러스 아밀로리퀴페이션스 케이티지비0202 및 이를 이용한 식물병원균의 방제방법에 관한 것이다.

본 발명은 작물의 흰가루병에 방제효과가 뛰어나며, 식물병원성 진균에 광범위한 항균활성을 가지며 담배모자이크바이러스의 감염을 억제하는 신규한 미생물 바실러스 아밀로리퀴페이션스 (*Bacillus amyloliquefaciens*) KTGB0202 (수탁번호 : KCTC 10564BP) 균과 이를 함유하는 친환경적 흰가루병 방제용 균 배양물을 제공한다.

또한, 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균의 배양물로부터 부탄올로 추출되고 실리카겔 컬럼크로마토그래피, 세파텍스 엘에이치-20으로 정제되는 신규의 항진균 활성물질인 KTGB0202-AF01을 제공한다.

본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균은 광범위한 항균력을 가지며, 활성의 지속성이 뛰어나고, 흰가루병을 포함한 다양한 식물병원균을 방제하는데 사용된다.

【대표도】

도 1

【색인어】

바실러스, 아밀로리퀴페이션스, 식물병원균, 항균활성, 흰가루병

【명세서】

【발명의 명칭】

신규한 미생물 바실러스 아밀로리퀴페이션스 케이티지비0202 및 이를 이용한 식물 병원균의 방제방법 {THE NOVEL BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS KTGB0202 AND CONTROL METHOD OF PLANT PATHOGENIC FUNGI USING THAT}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 KTGB0202 균의 전자현미경 사진

도 2는 본 발명의 KTGB0202 균으로부터 추출정제한 항진균물질 KTGB0202-AF01의 수소핵자기공명 ($^1\text{H-NMR}$) 스펙트럼

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<3> 본 발명은 신규한 미생물 바실러스 아밀로리퀴페이션스 케이티지비0202 및 이를 이용한 식물병원균의 방제방법에 관한 것이다.

<4> 현재 식물병원균의 발생억제 및 방제를 위한 방법으로 주로 사용하고 있는 것은 화학적 합성농약이다. 그러나 이러한 화학적 합성농약은 자연생태계 파괴를 초래하고, 잔류독성으로 인해 인체의 약제중독, 발암, 기형 및 각종 질환을 유발할 가능성이 매우 높아 그 사용이 제한되고 있다.

- <5> 따라서, 화학농약을 대체할 수 있는 저독성의 환경친화성 생물농약개발에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다.
- <6> 한국등록특허공보 10-0257452 (식물병 방제활성을 갖는 항균 펩티드를 생성하는 바실러스 서브틸리스 A405 균주 및 이를 이용한 식물병의 방제방법)에는 식물병 방제 활성을 갖는 항균 펩티드를 생성하는 바실러스 서브틸리스 A405 균주 (KFCC-11024)와 이 균주를 포함하는 미생물 제제를 방제하고자 하는 식물의 재배지에 살포함을 특징으로 하는 식물병의 방제방법에 관한 것이 공개되어 있다.
- <7> 한편, 흰가루병은 딸기, 오이 등 주요한 농가 소득원이 되는 작물에 발생하여 막대한 피해를 주고 있는 식물병 중의 하나이다. 특히, 최근에는 기존의 화학농약에 대한 내성균이 빈번하게 출현하여 화학요법으로는 방제에 한계를 느끼고 있는 실정이다.
- <8> 따라서, 생물농약으로서 흰가루병을 방제하고자 하는 노력은 천연물, 미생물 등을 이용한 방법들이 제시되어왔다.
- <9> 한국공개특허공보 특2002-0072813 (바실러스속 CMB26균, 이를 이용한 리포펩티드의 제조방법, 상기 바실러스속 CMB26균 및 /또는 리포펩티드를 유효성분으로 함유하는 식물곰팡이균의 살균제)에는 곰팡이의 포자 및 균사체 파괴능이 높은 리포펩티드를 생산하는 것을 특징으로 하는 신규한 미생물 바실러스속 CMB26균 (KFCC-11289) 및 이를 이용한 흰가루병, 만고병, 겉무늬 썩음병, 시들음병, 탄저병, 잣빛, 역병 또는 문고병 등의 식물곰팡이균의 살균제에 관한 것이 공개되어 있다.

<10> 그러나, 상기와 같은 바실러스속의 항진균 활성을 보이는 생물방제제는 다수 공개되어 있으나, 바실러스 아밀로리퀴페이션스 균주를 이용한 흰가루병을 포함한 식물병원균에 효과가 우수하면서도 저렴하고 안전한 미생물 농약은 보고되지 않고 있는 실정이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 상기의 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 식물병원균의 방제효과를 가지는 신규 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202를 제공하는데 그 목적이 있다.

<12> 또한, 이 신규 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202를 이용하여 광범위한 항균력을 가지며, 활성의 지속성이 뛰어나고, 물리화학적으로 안전한 흰가루병을 포함하는 식물병원균의 방제제와 그 방제방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<13> 본 발명은 신규한 미생물 바실러스 아밀로리퀴페이션스 케이티지비0202 및 이를 이용한 식물병원균의 방제방법에 관한 것이다.

<14> 본 발명은 각종 작물의 흰가루병에 방제효과가 뛰어나며, 식물병원성 진균에 광범위한 항균활성을 가지며 담배모자이크바이러스의 감염을 억제하는 신규한 미생물 바실러스 아밀로리퀴페이션스 (BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS) KTGB0202 (수탁번호 : KCTC 10564BP) 균을 제공한다.

- <15> 또한, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균이 생산하는 신규의 항진균 활성물질인 KTGB0202-AF01을 제공한다.
- <16> 또한, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균을 함유하는 친환경적 흰가루병 방제용 균 배양물을 제공한다.
- <17> 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균은 특별한 색소를 형성하지 않고, 생육 적온은 27 ~ 30 ℃이다.
- <18> 또한, 그람 양성세균이며 크기가 0.8 ~ 1.0 × 1.5 ~ 2.0 μm의 간상형 세균 (도 1)으로, 운동성을 갖고 카탈레이스 (catalase) 효소를 분비하는 호기성 세균이다.
- <19> 한편, 균체 지방산 분석결과는 표 1과 같다.
- <20> gyrase subunit A gene 유전자분석에 의한 염기서열은 서열목록 1과 같다.
- <21> 본 발명의 신규한 미생물을 바실러스 아밀로리퀴페이션스 (*Bacillus amyloliquefaciens*) KTGB0202로 명명하여, 2003년 12월 10일 생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KTCT 10564BP 로 기탁하였다.
- <22> 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균으로 부터 흰가루병균과 식물병원균에 항균활성을 갖는 배양물을 얻기 위한 배양은 뉴트리언트 한천 (nutrient agar)배지, 감자한천액체 (potato sucrose agar)배지 및 뮤엘라 힌톤 한천 (Mueller Hinton agar)배지 모두에서 가능하다.
- <23> 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균을 이용하여 방제 가능한 식물병원균은 흰가루병균 (Powdery mildew), 토마토잎 곰팡이병균 (*Cladosporium fulvum*), 고추탄저병균 (*Colletotrichum gloeosporioides*), 고추역병균

(*Phytophthora capsici*), 잿빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*), 벼문고병균 (*Rhizoctonia solani*), 근부병균 (*Fusarium oxysporum*), 토마토겍등근무늬병균 (*Alternaria solani*) 등이며, 그 외에 캔디다증 병원균 (*Candida albicans*)에도 균 생육 억제효과를 갖는다.

- <24> 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균은 80 °C 이상의 고온에서 안정하며, 배양액 조건으로 실온보관시 흰가루병 방제활성은 6 개월 이상 유지된다.
- <25> 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균의 방제대상 병원균 중 흰가루병균은 오이, 호박, 참외의 스페로데카 율지니아 (*Sphaerotheca fulginea*), 담배의 에리시페 타바시나 (*Erysiphe tabacina*), 토마토의 레베루라 타우리카 (*Leveillula taurica*) 딸기의 스페로데카 휴몰리 (*Sphaerotheca humuli*)에 더욱 효과적이다.
- <26> 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균에 의해 감염억제활성을 갖는 식물바이러스는 담배모자이크바이러스 (TMV) 이다.
- <27> 또한, 본 발명의 KTGB0202균이 배양액 중에 생산하는 항진균 활성물질은 지용성 레진으로 1차 분리되고, 실리카젤 크로마토그래피, LH-20겔 크로마토그래피로 정제되어, 흰색의 분말상인 물질로 제공되며 이 항진균 물질을 KTGB0202-AF01로 명명하였다. 이 활성물질의 수소핵자기공명 (¹H-NMR) 스펙트럼은 도 2와 같다.
- <28> 이하, 본 발명에 대하여 실시예와 실험예를 통하여 상세히 설명하나, 이들이 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- <29> <실시예 1> 바실러스 아밀로리퀴페이션스 (*Bacillus amyloliquefaciens*)
KTGB0202 균의 분리 및 동정

- <30> 대전광역시 유성구 신성동 소재 KT&G 중앙연구원 인근의 야산에 자생하는 참나무잎을 채집하여 준비하였다.
- <31> 채집한 잎을 물로 씻고 풍건한 후 1 % 차아염소산나트륨으로 표면상균하고 막자사발로 충분히 갈아 증류수로 희석하였다.
- <32> 이 희석액을 뮤엘라 힌톤 한천 (Mueller Hinton agar) 배지에 중층법으로 처리하여 27 ℃ 배양기에서 2 ~ 3 일 배양한 후 몇번의 계대배양을 거쳐 순수하게 분리하였다.
- <33> 균주의 동정은 형태관찰과 생리적 특성 및 균체 지방산 분석 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 실시하였다.
- <34> 상기의 균주는 뉴트리언트 한천 (nutrient agar) 배지, 포테이토 슈크로스 한천 (potato sucrose agar) 배지 및 뮤엘라 힌톤 한천 (Mueller Hinton agar) 배지에서 양호하게 생육하며, 특별한 색소를 형성하지 않고, 생육 적온은 27 ~ 30 ℃이다.
- <35> 또한, 그람 양성세균이며 크기가 0.8 ~ 1.0 × 1.5 ~ 2.0 μm의 간상형 세균 (도 1)으로, 운동성을 갖고 카탈레이스 (catalase) 효소를 분비하는 호기성 세균이다.
- <36> 균체 지방산 분석결과는 표 1과 같다.
- <37> <표 1> KTGB0202 균의 지방산 조성분석

<38>

지방산 조성	KTGB0202 균
C14:0 ISO	1.06
C14:0	1.02
C15:0 ISO	20.39
C15:0 ANTEISO	43.73
C16:0 ISO	2.95
C16:1 w1 1c	1.35
C16:0	7.53
C17:0 ISO	8.00
C17:0 ANTEISO	11.96

- <39> 동정된 균주의 gyrase subunit A gene 유전자분석에 의한 염기서열은 첨부된 서열목록의 서열번호 1과 같다.
- <40> 이상의 균 동정결과를 종합하여 바실러스 아밀로리퀴페이션스 (*Bacillus amyloliquefaciens*)로 동정하고, KTGB0202 균주라 명명하였다.
- <41> 분리 동정된 균주를 특허출원을 위한 국제미생물기탁기관인 한국생명공학연구원 유전자은행에 2003년 12월 10일 기탁번호 KCTC 10564BP로 기탁하였다.
- <42> <실시예 2> 바실러스 아밀로리퀴페이션스 (*Bacillus amyloliquefaciens*)
KTGB0202 균주의 배양
- <43> 실시예 1의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균주를 준비하였다.
- <44> 뮤엘라 힌톤 한천 (Mueller Hinton agar) 배지를 준비하였다.
- <45> 준비한 뮤엘라 힌톤배지 21 g을 1 ℓ의 증류수에 넣어 잘 녹인 후 500 ml 삼각플라스크에 200 ml씩 분주하고, 1.5 기압 121 °C로 20 분간 고압 살균하여 제조하였다.
- <46> 제조된 배지에 플레이트 상태의 KTGB0202 균을 백금리로 취하여 접종한 후 27 °C에서 100 ppm으로 흔들어주면서 4 일간 배양하였다.
- <47> 배양액은 약한 노란색을 띠고 점성을 보이며 pH는 6.79 였다.
- <48> <실시예 3> KTGB0202 균이 생산하는 항진균 물질 KTGB0202-AF01의 분리 및 정제

- <49> 실시예 2의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 균의 배양액을 준비하였다.
- <50> 준비한 배양액을 다이온이온 HP10 (Diaion-HP10) 레진 (resin)이 충전되어 있는 유리 컬럼을 통과시켰다.
- <51> 흡착되어 있는 항진균 물질은 70 % 함수 아세톤으로 추출하고 농축하였다.
- <52> 농축물은 소량의 클로로포름 (CHCL₃) 과 메탄올 (MeOH)에 녹여서 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다.
- <53> 상기 용매계를 7 : 3 ~ 0 : 1 까지 극성을 점점 높여가며 활성물질을 전개하여 3 : 7 ~ 1 : 9 부분에서 가장 활성이 강한 물질을 정제하였다.
- <54> 정제물은 감압농축 후 소량의 메탄올에 녹인 후 동일 용매를 전개용매로 LH-20 (Sephadex LH-20) 겔 크로마토그래피를 수행하여 최종 정제하였다.
- <55> 최종 정제물은 에틸아세티이트 (EtOAC) , 클로로포름 (CHCL₃) 등의 비극성 용매에는 녹지 않았으며, 메탄올에는 약간, 톨로로포름과 메탄올의 1 : 1 혼합요액과 물에는 잘 녹았다.
- <56> 상기의 활성물질의 수소핵자기공명 (¹H-NMR) 스펙트럼은 도 2와 같다.
- <57> <실험예 1> KTGB0202 균의 배양 시간별 활성변화 측정실험
- <58> 배양시간에 따른 항균, 항바이러스 및 흰가루병 방제효과의 변화를 알아보기 위해 뮤엘라 힌톤 액체배지를 사용하여 27 ℃ , 110 rpm의 조건으로 배양하면서 시간별로 시료를 채취한 후 각각의 활성을 조사하였다.

<59> 항균효과는 토마토 잎곰팡이병균에 페이퍼디스크법으로 조사하였고, 항바이러스
효과는 잔티엔씨 담배품종 잎에서 전처리법으로 조사하였다.

<60> 또, 흰가루병 방제효과는 5배 희석액을 5일 간격으로 1일 3회 경엽살포하여 7일
후 결과를 조사하여 표 2에 나타내었다.

<61> <표 2> KTGB0202 균의 배양시간에 따른 활성의 변화

<62>

배양시간	항균효과 (mm)	항바이러스효과 (%)	흰가루병 방제효과 (%)	OD (660nm)	pH
0	0	0	0	0.012	7.70
6	0	0	0	0.063	7.65
12	0	0	12.5	0.644	7.19
24	약	0	75.0	0.758	6.88
48	약	0	75.0	0.919	7.22
72	12	50	75.0	0.780	6.75
96	13	60	87.5	0.578	6.79
120	13	67	87.5	0.471	6.62
144	11	85	87.5	0.525	6.70
168	11	76	100	0.468	6.72
192	10	82	87.5	0.433	7.09
수돗물	0	0	0	-	-

<63> 표 2에서 보는바와 같이, 항균효과와 흰가루병 방제효과는 24 시간 배양 후부터
확인되었으며, 항바이러스 효과는 72 시간 배양물부터 확인되었다.

<64> 또, 균수는 48 ~ 72 시간 배양시 최대가 되었다.

<65> <실험예 2> KTGB0202 균 배양물 농도에 따른 담배 모자이크 바이러스 (TMV) 감염
억제 효과실험

<66> 본 발명의 실시예 1의 KTGB0202 균의 뮤엘라 힌톤 액체 배양액을 10,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상징액과 균체로 구분하고, 이들을 멸균증류수로 희석한 후 잔티-엔시 (Xanthi-nc) 담배의 잎에 도말하였다.

<67> 도말 하루 후 담배모자이크 바이러스를 접종하여 감염억제 효과를 조사하여 표 3에 나타내었다.

<68> <표 3> KTGB0202 균의 담배모자이크바이러스 감염억제 활성

<69>

처리내용	바이러스 감염억제효과 (%)
배양물원액	98
배양물 2 배 희석액	95
배양물 10 배 희석액	70
배양물 20 배 희석액	50
배양물 50 배 희석액	20
수돗물	0

<70> 상기의 표 3에서 보는 바와 같이, 본 발명의 KTGB0202 균 배양물 10 배 희석액 부터는 바이러스 감염효과가 현저히 떨어지는 것을 알 수 있었다.

<71> <실험예 3> KTGB0202 균의 항진균 활성실험

<72> 본 발명의 실시예 1의 KTGB0202 균을 뮤엘라 힌톤 한천배지에서 3 ~ 4 일간 배양한 후 0.6 cm 직경의 아가 플러그 (agar plug)를 만들어 포테이토 텍스트로스 한천배지상의 식물병원균 검정균과 대치배양한 후 생육저지 거리를 조사하여 항균활성을 조사하였다.

<73> 항진균 활성을 조사한 결과는 표 4에 나타내었다.

<74> <표 4> KTGB0202 균의 항진균 활성 스펙트럼

<75>

병원균	항진균 활성 (mm)
토마토잎 곰팡이병균 (Cladosporium fulvum)	8
고추탄저병균 (Colletotrichum gloeosporioides)	6
갯빛곰팡이병균 (Botrytis cinerea)	2.5
고추역병균 (Phytophthora capsici)	10
벼문고병균 (Rhizoctonia solani)	8
근부병균 (Fusarium oxysporum) (시들음병)	5
토마토겉통근무늬병균 (Alternaria solani)	4
칸디다증 병균 (Candida albicans)	4

<76> <실험예 4> 담배 흰가루병에 대한 방제효과 실험

<77> 흰가루병에 대한 예방 및 치료효과는 온실조건의 포트에서 재배중인 담배를 이용하여 실시하였다.

<78> 본 발명의 실시예 2의 배양물은 담배 잎에 흰가루병균 병반이 10 % 이상 발병 시 처리하였으며, 최종 살포 7 일 후에 발병율을 조사하여 방제효과를 확인하였다.

<79> 1. KTGB0202 균 배양물의 담배 흰가루병 방제효과 실험

<80> 온실에서 생육 중인 담배에 본 발명의 실시예 2의 배양물을 처리하여 병 발생과 치료효과를 조사하였다.

<81> 배양물 활성성분의 열에 대한 안정성 조사는 100 ℃로 30 분간 실시하였으며, 그 결과는 표 5에 나타내었다.

<82> <표 5> KTGB0202 균의 담배 흰가루병 방제효과 실험결과

<83>

처리내용	발병율 (%)	방제가 (%)
균배양물	8.9	91.1
균배양물 (열처리)	11.5	88.5
수돗물	100	0

<84>

상기의 표 5에서 보는바와 같이, 본 발명의 KTGB0202 균 배양물 처리시 담배 흰가루병에 대한 방제효과는 91.1 %로 매우 우수하였으며, 열처리에 의한 활성의 소실은 미미한 수준으로 열에 대한 안정성이 확인되었다.

<85>

2. KTGB0202 균 배양물의 희석농도별 담배 흰가루병 방제효과실험

<86>

본 발명의 실시예 2의 배양물을 멸균증류수로 10 배에서 100 배까지 희석하여 담배 흰가루병 방제효과를 조사하였다.

<87>

각각을 5 일 간격으로 3회 경엽살포하여 7일 후 결과를 조사하여 표 6에 나타내었다.

<88>

<표 6> KTGB0202 균 배양물의 희석농도별 담배 흰가루 방제효과실험 결과

<89>

희석배수	발병율 (%)	방제가 (%)
1 배	0	100
5 배	5.0	95.5
10 배	12.5	87.5
20 배	25.0	75.0
50 배	45.0	55.0
100 배	67.5	32.0
수돗물	100	0

<90>

상기의 표 6에서 보는 바와 같이, 본 발명의 배양물 50 배 희석시 55.5 %의 방제효과를 보였으며, 원액을 사용한 경우 처리된 담배 잎에서 흰가루병이 전혀 발생하지 않았다.

<91> 3. KTGB0202 균 배양물 처리법에 따른 담배 흰가루병의 방제효과실험

<92> 실시예 2의 KTGB0202 균 배양물을 담배잎 표면, 이면, 양면에 배양물 5 배 희석액을 5 일 간격으로 3회 살포하여 7일 후 결과를 조사하여 표 7에 나타내었다.

<93> <표 7> KTGB0202 균 처리방법에 따른 담배 흰가루병 방제효과실험 결과

<94>

처리면	발병율 (방제가 (%))	
	표면	이면
표면	12.5 (87.5)	50.0 (50.0)
이면	100 (0)	0 (100)
표면/이면	12.5 (87.5)	0 (100)
수돗물	100 (0)	100 (0)

<95> 상기의 표 7에서 보는 바와 같이, 표면 처리시 이면에서의 병 방제효과도 50 % 확인되었으며, 가장 완전한 방제효과는 양면 모두에 배양물을 처리시 확인되었다.

<96> <실험예 5> KTGB0202 균 배양물의 딸기 흰가루병 방제효과실험

<97> 실시예 2의 KTGB0202 균 배양물의 딸기 흰가루병 방제효과를 알아보기 위해, 충남 논산에 위치한 논산 딸기시험장에서 재배중인 매향 품종에 배양물을 6 ~ 7 일 간격으로 3회 살포하였다.

<98> 각회 처리 5 ~ 7 일 후 딸기를 수확하여 이병과율과 이병엽율을 조사하여 표 8, 9에 나타내었다.

<99> <표 8> KTGB0202 균의 딸기 과일에서의 흰가루병 방제효과실험 결과

<100>	처리내용	1차 살포 7일 후		2차 살포 5일 후		3차 살포 9일 후	
		이병과율 (%)	방제가 (%)	이병과율 (%)	방제가 (%)	이병과율 (%)	방제가 (%)
	10배 희석	17.6	35.5	11.0	72.6	7.5	89.8
	30배 희석	13.4	50.9	17.5	56.5	9.5	87.1
	50배 희석	15.4	43.6	34.4	14.4	12.5	83.1
	수돗물	27.3	-	40.2	-	73.8	-

<101> <표 9> KTGB0202 군의 딸기 잎의 흰가루병 방제효과실험 결과

<102>	처리내용	발병율 (%)	방제효과 (%)
	배양물 10 배 희석	2.45	96.5
	배양물 30 배 희석	13.3	80.8
	배양물 50 배 희석	20.4	70.5
	수돗물	69.3	-

<103> 상기의 표 8과 표 9에서 보는 바와 같이, 과일에서의 병 발생은 최고 89.8 % 까지 방제되었고, 잎에서의 최고 병발생억제효과는 96.5 %였다.

<104> <실험예 6> KTGB0202 군 배양물의 호박 흰가루병 방제효과 실험

<105> 실시예 2의 KTGB0202 군 배양물의 호박 흰가루병 방제효과를 조사하기 위해 공주시 소재 호박 재배농가의 흰가루병이 만연한 호박잎에 본 발명의 배양물을 경엽살포하여 방제효과를 조사하였다.

<106> 3 ~ 4 일 간격으로 3회 살포한 다음 8일 후 잎의 발병도를 조사하여 표 10에 나타내었다.

<107> <표 10> KTGB0202 군 배양물의 호박 흰가루병 방제효과 실험결과

<108>	처리내용	발병율 (%)	방제효과 (%)
	배양물 10 배 희석	2.5	97.4
	배양물 30 배 희석	4.5	95.3
	배양물 50 배 희석	10.5	89.2
	수돗물	97.5	-

<109> 상기의 표 10에서 보는 바와 같이, 이미 병이 심하게 만연된 상태에서 살포하였으나 89.2 ~ 97.4 %의 높은 방제효과를 보여, 본 발명의 배양물이 예방효과는 물론 치료효과도 우수하다는 것을 알 수 있었다.

<110> <실험예 7> KTGB0202 균 배양물의 오이 흰가루병 방제효과실험

<111> 온실조건의 포트에서 재배 중인 오이 잎에 흰가루병이 10 % 정도 발생 시 균 배양물을 살포하고 잎에서의 병 방제효과를 조사하였다.

<112> 일주일 간격으로 3 회 살포하고 7일 후 처리 잎의 발병도를 조사하여 표 11에 나타내었다.

<113> 트리후민은 농가 권장 사용농도인 4000 배 희석액을 사용하였다.

<114> <표 11> KTGB0202 균 배양물의 오이 흰가루병 방제효과 실험결과

<115>	처리내용	발병율 (%)	방제효과 (%)
	배양물 10 배 희석	2.46	97.54
	배양물 30 배 희석	12.6	87.40
	배양물 50 배 희석	3.41	96.59
	지하수	100	-

<116> 상기의 표 11에서 보는 바와 같이, 본 발명의 배양물을 처리한 결과 배양물 10 배 희석농도에서는 대조약제인 트리후민과 대등한 효과를 보였다.

<117> <실험예 8> KTGB0202 균 배양물의 참외 흰가루병 방제효과실험

<118> 온실조건의 참외에 흰가루병이 10 % 정도 발생시기에 균 배양물을 일주일 간격으로 3 회 살포한 후 7일 후 결과를 조사하였다.

<119> 트리후민과 웨나리는 농가 권장 사용농도인 4000 배 희석액을 사용하였다.

<120> 참외 흰가루병 이병잎을 처리 전 후에 샘플하여 치료효과를 산출하여 표 12에 나타내었다.

<121> <표 12> KTGB0202 균 배양물의 참외 흰가루병 방제효과 실험결과

<122>

처리내용	처리전 발병 잎 수/처리 후 발병 잎 수	치료효과
배양물 10 배 희석	11/0	100
배양물 30 배 희석	5/1	80
트리후민	10/0	100
웨나리	9/6	33.4
수돗물	6/6	0

<123> 상기의 표 12에서 보는 바와 같이, 90 ~ 100 %의 우수한 방제효과를 보였으며, 신생 잎에서의 발병억제 효과도 우수하여 대조약제 트리후민에 비해 예방효과가 우수하였다.

<124> <실험예 9> KTGB0202 균 배양물의 토마토 흰가루병 방제효과실험

<125> 충남 부여군 소재 부여 토마토 시험장에 재배 중인 토마토에 흰가루병이 만연된 상태에서 배양물을 일주일 간격으로 3 회 경엽살포한 후 7 일 후 잎에서의 발병억제 효과 결과를 조사하여 표 13에 나타내었다.

<126> <표 13> KTGB0202 균 배양물의 토마토 흰가루병 방제효과 실험결과

<127>	처리내용	발병율 (%)	방제효과 (%)
	배양물 10 배 희석	4.43	95.57
	배양물 30 배 희석	10.52	89.48
	수돗물	100	0

<128> 상기의 표 13에서 보는 바와 같이, 병이 만연된 상태에서 배양물을 처리하였음에도 불구하고, 방제효과가 89.48 ~ 95.57 %로 우수한 치료효과를 나타내었다.

<129> <실험예 10> 항진균물질 KTGB0202-AF01의 항진균활성 실험

<130> 본 발명의 실시예 3의 항진균물질 KTGB0202-AF01을 준비하였다.

<131> 준비한 KTGB0202-AF01을 메탄올에 녹여 100 ppm 농도로 조절한 후 직경 8 mm의 페이퍼 디스크에 묻혀 식물병원진균 및 캔디다균에 대한 생육저지 효과를 조사하였다.

<132> 그 결과를 아래의 표 14에 나타내었다.

<133> <표 14> 항진균물질 KTGB0202-AF01의 항진균활성 실험결과

<134>	병원균	항진균활성 (저지환, mm)
	토마토잎 곰팡이병균 (Cladosporium fulvum)	12
	고추탄저병균 (Colletotrichum gloeosporioides)	14
	고추역병균 (Phytophthora capsici)	9
	잣빛곰팡이병균 (Botrytis cinerea)	10
	벼문고병균 (Rhizoctonia solani)	11
	근부병균 (Fusarium oxysporum, 일명 시들음병)	9
	토마토겍둥근무늬병균 (Alternaria solani)	13
	캔디다증 병균 (Candida albicans)	12

<135> 상기의 표 14에서 보는바와 같이, 본 발명의 항진균 물질인 KTGB0202-AF01의 항진균 활성을 확인할 수 있었다.

【발명의 효과】

<136> 본 발명에 의해 식물병원균의 방제효과를 가지는 신규 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202가 제공된다.

<137> 또한, 이 신규 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202를 이용하여 광범위한 항균력을 가지며, 활성의 지속성이 뛰어나고, 물리화학적으로 안전한 흰가루병을 포함하는 식물병원균의 방제와 그 방제방법이 제공된다.

<138> 또한, 이 신규한 미생물이 생산하는 항진균 활성물질 KTGB0202-AF01이 제공되며, 이 미생물을 이용하여 광범위한 항균력을 가지며, 활성의 지속성이 뛰어나고, 흰가루병을 포함하는 식물병원균의 방제와 그 방제방법이 제공된다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

식물병원성 진균에 대한 항진균 활성 및 식물바이러스 감염억제효과를 갖는 바실러스 아밀로리퀴페이선스(*Bacillus amyloliquefaciens*) KTGB0202 (수탁번호 : KCTC 10564BP) .

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

식물병원성 진균은 흰가루병균 (*Powdery mildew*) , 토마토잎 곰팡이병균 (*Cladosporium fulvum*) , 고추탄저병균 (*Colletotrichum gloeosporioides*) , 고추역병균 (*Phytophthora capsici*) , 잿빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*) , 벼문고병균 (*Rhizoctonia solani*) , 근부병균 (*Fusarium oxysporum*) , 토마토겉등근무늬병균 (*Alternaria solani*) , 캔디다증 병균 (*Candida albicans*) 중에서 선택된 1종인 것이 특징인,

바실러스 아밀로리퀴페이선스 KTGB0202 .

【청구항 3】

제 2항에 있어서,

흰가루병균은 오이, 호박, 참외의 스페로데카 헬지니아 (*Sphaerotheca fulginea*) , 담배의 에리시페 타바시나 (*Erysiphe tabacina*) , 토마토의 레베루라 타우

리카 (*Leveillula taurica*) 딸기의 스페포데카 휴물리 (*Sphaerotheca humuli*) 중에서
선택된 1종인 것이 특징인,

바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202.

【청구항 4】

제 1항에 있어서,

식물바이러스는 담배모자이크바이러스 (TMV) 인 것이 특징인,

바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202.

【청구항 5】

제 1항의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 배양물을 이용하여 식물병원균
을 방제하는 방법.

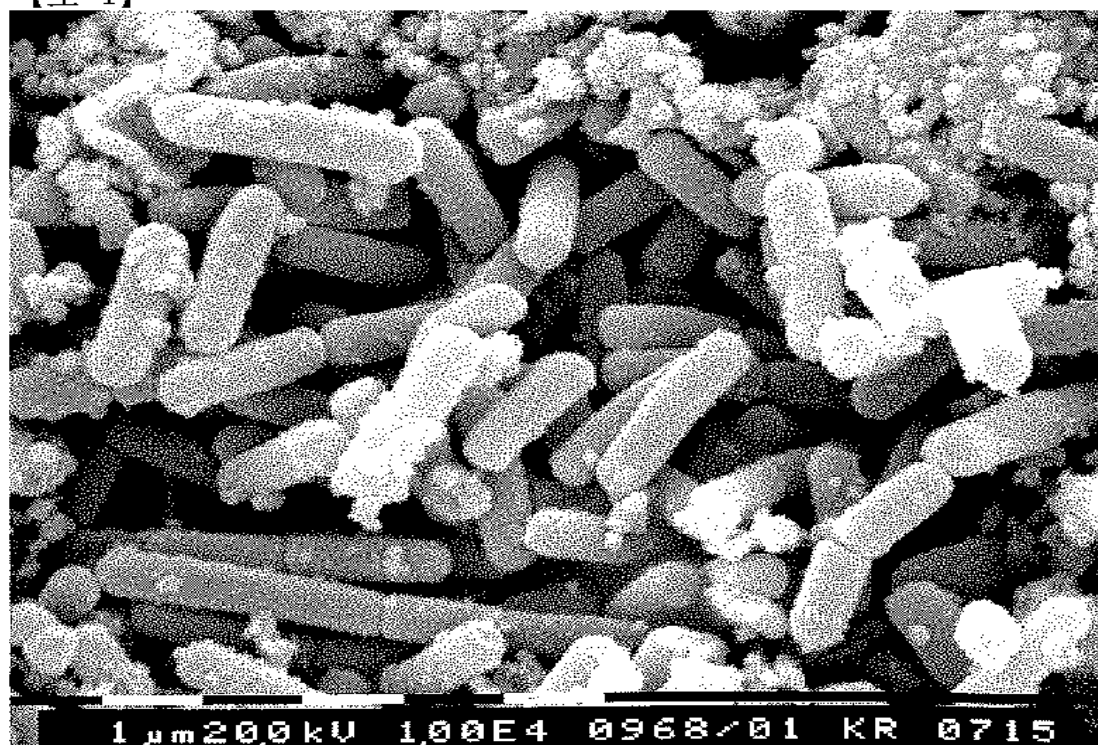
【청구항 6】

제 1항의 바실러스 아밀로리퀴페이션스 KTGB0202 배양물로부터 부탄올로 추출되
고, 실리카겔 컬럼크로마토그래피, 세파텍스 엘에이치-20으로 정제하여 얻어진 항진
균활성을 나타내는,

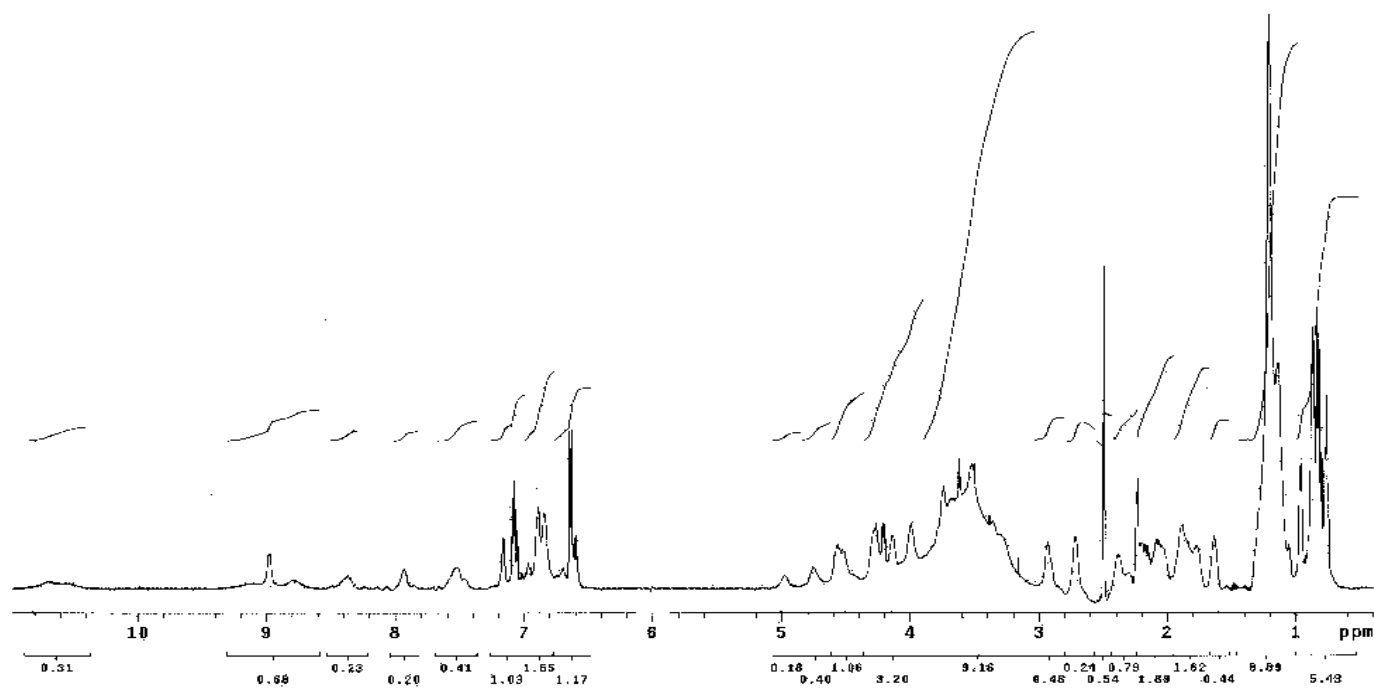
항진균물질 KTGB0202-AF01.

【도면】

【도 1】



【도 2】



【서열목록】

<110> KT&G Co.,LTD. <120> THE NOVEL BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS KTGB0202 AND CONTROL
METHOD OF PLANT PATHOGENIC FUNGI USING THAT <160> 1 <170> KopatentIn 1.71 <210>
1 <211> 963 <212> DNA <213> Bacillus amyloliquefaciens <400> 1 gcaatgagcg
ttatcgtatc ccgggcgctt ccggatgtgc gtgacggctc gaagccggtt 60 cacaggcgga tttgtacgc
aatgaatgat ttaggcatga ccagtgacaa accatataaa 120 aaatctgccc gtatcgtcgg tgaagttatc
ggtaagtacc acccgcacgg tgactcagcg 180 gtttacgaat caatggtcag aatggcgag gattttaact
accgctacat gcttgttgac 240 ggacacggca acttcggttc ggttgacggc gactcagcgg ccgcgatgcg
ttacacagaa 300 gcgagaatgt caaaaatcgc aatggaaatc ctccgggaca ttacgaaaga tacgattgat
360 tatcaagata actatgacgg cgcagaaaaga gaacctgtcg tcatgccttc gagatttccg 420 aatctgctcg
taaacggagc tgccggtatt gcggtcggaa tggcgacaaa tattcctccg 480 catcagcttg gggaagtcac
tgaaggcgtg cttgccgtaa gtgagaatcc tgagattaca 540 aaccaggagc tgatggaata catcccgggc
ccggattttc cgactgcagg tcagattttg 600 ggccggagcg gcatccgcaa ggcatatgaa tccggacggg
gatccattac gatccgggct 660 aaggctgaaa tcgaagagac atcatcgga aaagaaagaa ttattgtcac
agaacttcct 720 tatcaggatga acaaagcgag attaattgaa aaaatcgcag atcttgtccg ggacaaaaaa
780 atcgaaggaa ttaccgatct gcgtgacgaa tccgaccgta acggaatgag aatcgtcatt 840 gagatccgcc
gtgacgcaa tgctcacgtc attttgaata acctgtacaa acaaacggcc 900 ctgcagacgt ctttcggaat
caacctgctg gcgctcggtg acggacagcc gaaggtacta 960 agc
963